

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: 84110018.3

51 Int. Cl.⁴: C 12 Q 1/52

22 Anmeldetag: 22.08.84

30 Priorität: 22.08.83 DE 3330246

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.05.85 Patentblatt 85/19

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

71 Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
Patentabteilung, Abt. E Sandhofer Strasse 112-132
Postfach 31 01 20
D-6800 Mannheim 31 Waldhof(DE)

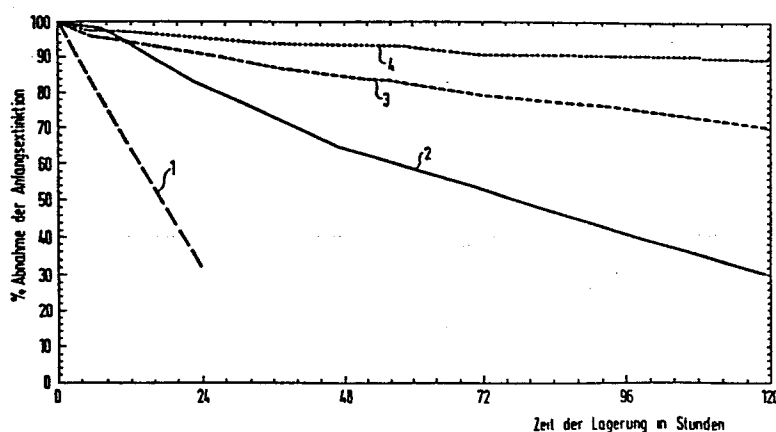
72 Erfinder: Möller, Gerald, Dr.
Waxensteinstrasse 17
D-8132 Tutzing(DE)

74 Vertreter: Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al,
Patentanwälte Dipl.-Ing. H. Weickmann Dipl.-Phys. Dr.
K. Fincke Dipl.-Ing. F. A. Weickmann Dipl.-Chem. B. Huber
Dr.-Ing. H. Liska Dipl.-Phys. Dr. J. Prectel Möhlstrasse 22
D-8000 München 80(DE)

54 **Verfahren und Reagenz zur Bestimmung von Transaminasen.**

57 Zur Bestimmung der Transaminasen durch Umsetzung einer entsprechenden Aminosäure mit α -Ketoglutarinsäure zu Glutarsäure und der der eingesetzten Aminosäure entsprechenden α -Ketosäure und Messung der gebildeten α -Ketosäure durch Reduktion mit NADH in Gegenwart von

Lactatdehydrogenase (LDH) und gegebenenfalls Malatdehydrogenase (MDH) unter Bildung von NAD^+ und α -Oxidsäure verwendet man LDH aus *Lactobacillus leichmanii* DSM 2699.



B e s c h r e i b u n g

Menschliches Gewebe enthält die Transaminasen Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) EC 2.6.1.2 und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) EC 2.6.1.1 in Muskeln, Serum und Organen. Die Messung des GPT-Gehaltes insbesondere im Serum, stellt einen wichtigen klinischen Parameter zur Unterscheidung von Leber- und Herzerkrankungen dar.

Die GPT kommt fast ausschließlich in der Leber vor, wo sie nur im Zytoplasma der Parenchymzellen vorhanden ist, während die GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) zu je etwa 50 % im Zytoplasma und in den Mitochondrien vorliegt. Aus dieser Lokalisation der beiden Transaminasen ergeben sich wertvolle diagnostische Hinweise bei den verschiedenen Lebererkrankungen. Höhere GOT-Werte sprechen für eine schwere Leberparenchymzellschädigung.

Bei akuter Hepatitis sind stets GOT und GPT im Serum erhöht, auch bei anikterischem Verlauf. Oft kann man den Enzymaktivitätsanstieg schon vor dem Erscheinen des Ikterus nachweisen.

Bei chronischer Hepatitis und Cirrhose sind GOT und GPT niedriger als bei der Virushepatitis. Ihre Bestimmung ist bei den chronischen Leberentzündungen vor allem zur Überwachung des Krankheitsverlaufes und der Therapie wertvoll.

Die Bestimmung der GOT wird daneben auch zur Diagnostik von Erkrankungen des Herzmuskels eingesetzt.

Ein übliches und viel verwendetes Verfahren zur Bestimmung von GPT bzw. GOT benutzt die Transaminierung von α -Ketoglutarsäure mit Alanin bzw. Aspartat, die durch diese Enzyme katalysiert wird und zur Bildung von Glutamatsäure und Pyruvat bzw. Oxalacetat führt. Pyruvat bzw. Oxalacetat wird durch Reduktion mit NADH in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) und gegebenenfalls MDH in Lactat bzw. Malat und NAD^+ umgesetzt, wobei letzteres nach bekannten Methoden entweder direkt im UV oder mit Hilfe einer nachgeschalteten Farbreaktion gemessen wird.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht nun darin, daß LDH selbst eine Unspezifität (Nebenaktivität) aufweist, die zu einer Umsetzung von α -Ketosäuren, insbesondere von α -Keto-glutarsäure unter Bildung von α -Hydroxyglutarsäure führt und als α -Hydroxyglutarat-Dehydrogenase-Aktivität bezeichnet werden kann.

Diese Unspezifität hat außerdem zur Folge, daß ein entsprechendes Reagenz zur Durchführung dieses bekannten Verfahrens nur eine ungenügende Stabilität aufweist, da bei der Bildung von α -Hydroxyglutarat NADH zu NAD oxidiert wird. Dies verursacht eine Schleichreaktion

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, dieses Problem zu lösen.

Erfindungsgemäß gelingt dies bei einem Verfahren zur Bestimmung der Transaminasen durch Umsetzung einer entsprechenden Aminosäure mit α -Ketoglutarsäure zu Glutamatsäure und der der eingesetzten Aminosäure entsprechenden α -Ketosäure und Messung der gebildeten α -Ketosäure durch Reduktion mit NADH in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) und gegebenenfalls

Malatdehydrogenase (MDH) unter Bildung von NAD^+ und α -Oxisäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man D-LDH eines Milchsäurebakteriums verwendet.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Entdeckung, daß D-LDH von Milchsäurebakterien auch in Gegenwart von NADH α -Oxoglutarsäure nicht reduziert. Ersetzt man daher die bisher üblicherweise verwendete LDH aus Schweineherz in dem oben angegebenen Verfahren erfindungsgemäß durch D-LDH eines Milchsäurebakteriums, so tritt die störende Schleichreaktion nicht mehr auf und man erhält ein hinsichtlich seiner Lagerstabilität wesentlich verbessertes Reagenz.

Die vorteilhaften Ergebnisse gemäß der Erfindung erhält man mit jeder D-LDH aus Milchsäurebakterien. D-LDH bildende Milchsäurebakterien gehören im wesentlichen den Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc* an (Antonie van Leeuwenhoek 49, (1983) 210). Soweit Milchsäurebakterien L-LDH bilden, ist diese nicht geeignet. Soweit ein Stamm sowohl D-LDH als auch L-LDH bildet, muß eine Trennung dieser beiden Enzyme durchgeführt werden. Bevorzugt werden daher D-LDH-Präparate aus Stämmen, die lediglich D-LDH enthalten. Besonders gute Ergebnisse ergibt die LDH aus *Lactobacillus leichmannii*, DSM 2699, bei der es sich um eine D-LDH handelt. Weitere bevorzugte Stämme sind *Lactobacillus lactis*, DSM 20072, *Lactobacillus plantarum*, DSM 20174, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193 oder *Pediococcus pentosaceus* DSM 20280.

Wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) eingesetzt, so verwendet man als Aminosäure Alanin, welches zu Pyruvat desaminiert und dann zu Lactat reduziert wird. Handelt

es sich um die Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) so wird als Aminosäure Aspartat eingesetzt, welches zu Oxalacetat desaminiert und dann zu Malat reduziert wird.

Ein erfindungsgemäßes Reagenz zur Bestimmung von Transaminasen, enthaltend LDH, α -Oxoglutarat, die entsprechende Aminosäure, NADH, Puffer pH 6,5 bis 8,5 und gegebenenfalls MDH, zeichnet sich daher dadurch aus, daß es D-LDH eines Milchsäurebakteriums enthält.

Im Falle der GPT-Bestimmung enthält das Reagenz als Aminosäure Alanin. Im Falle der GOT-Bestimmung enthält das Reagenz als Aminosäure Aspartat und außerdem Malatdehydrogenase (MDH).

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Reagenz zur Bestimmung von GPT
250 bis 20000 U/l D-LDH aus Milchsäurebakterien
2,5 bis 100 mMol/l α -Oxoglutarat,
50 bis 1000 mMol/l Alanin,
0,01 bis 0,25 mMol/l NADH und
10 bis 500 mMol/l Puffer pH 6,5 bis 8,5.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Reagenz zur Bestimmung von GOT
250 bis 20000 U/l D-LDH aus Milchsäurebakterien
2,5 bis 100 mMol/l α -Oxoglutarat
20 bis 1000 mMol/l Aspartat
0,01 bis 0,25 mMol/l NADH
100 bis 20000 U/l MDH und
10 bis 500 mMol/l Puffer pH 6,5 bis 8,5.

Im Rahmen der Erfindung beträgt die besonders bevorzugte Endkonzentration der einzelnen Bestandteile des GPT-Puffers im Test LDH: 1000 bis 1400 U/l, Alanin 600 bis 800 mMol/l, NADH 0,10 bis 0,20 mMol/l, α -Oxoglutarat 10 bis 25 mMol/l und Puffer 50 bis 100 mMol/l pH 7,3 bis 7,5.

Die entsprechenden Werte für die Konzentration im Test beim GOT-Reagenz sind 1000 bis 1400 U/l LDH, 500 bis 1000 U/l MDH, 0,10 bis 0,20 mMol/l NADH, 150 bis 250 mMol/l Aspartat und 10 bis 20 mMol/l α -Oxoglutarat und Puffer 50 bis 100 mMol/l pH 7,3 bis 7,5.

Als Puffer kommen die im angegebenen pH-Bereich wirksamen Puffersubstanzen in betracht. Bevorzugt werden Trispuffer, Trapuffer (Triethanolamin) und Phosphatpuffer.

Der erfindungsgemäß erzielte Effekt ist in der Figur der beigefügten Zeichnung dargestellt. In dieser wird die prozentuale Abnahme der Anfangsextinktion gegen die Lagerungszeit in Stunden für ein bekanntes Verfahren bzw. Reagenz im Vergleich zu einem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. Reagenz angegeben. Für die Bestimmung der in der Figur wiedergegebenen Werte wurde ein im Handel unter der Bezeichnung "Monotest[®] a ALAT/ALT/GPT" erhältlich Reagenz zur Bestimmung von GPT der Boehringer Mannheim GmbH verglichen mit einem erfindungsgemäßen Reagenz. Die Konzentration im Test war wie folgt:

1200 U/l LDH,
0,180 mMol/l NADH,
15 mMol/l α -Oxoglutarat,
500 mMol/l Alanin,
100 mMol/l Trispuffer pH 7,5.

Das bekannte Reagenz enthielt LDH aus Schweineherz; das erfindungsgemäße Reagenz enthielt D-LDH aus *Lactobacillus leichmannii* DSM 2699.

In der Figur stellen dar:

- Kurve 1 das handelsübliche Reagenz bei 25°C (Wasserbad),
- Kurve 2 das handelsübliche Reagenz bei +4°C (Eisbad),
- Kurve 3 das erfindungsgemäße Reagenz bei 25°C (Wasserbad),
- Kurve 4 das erfindungsgemäße Reagenz bei +4°C (Eisbad).

Man erkennt daraus, daß bei 25°C beim bekannten Reagenz nach etwa 34 Stunden das gesamte NADH verschwunden ist, während beim erfindungsgemäßen Reagenz noch nach 120 Stunden ca. 71% der Anfangsextinktion erhalten werden. Die entsprechenden Werte bei 4°C und 120 Stunden Lagerungszeit sind für das bekannte Reagenz 30% Restextinktion, für das erfindungsgemäße Reagenz 90%. Analoge Ergebnisse wie bei Schweineherz LDH werden erhalten, wenn anstelle von LDH aus Schweineherz L-LDH aus *L. casei*, *L. xylosus*, *B. Stearothermophilus* oder *L. plantarum* eingesetzt wird.

Identische Kurven werden auch erhalten, wenn man anstelle des oben angegebenen handelsüblichen Reagenz für die GPT-Bestimmung ein entsprechendes handelsübliches Reagenz für die GOT-Bestimmung verwendet, welches unter der Bezeichnung "Monotest[®] a ASAT/AST/GOT" erhältlich ist. Die Konzentration im Test war hierbei

wie folgt:

600 U/l LDH,
420 U/l MDH,
0,180 mMol/l NADH,
12 mMol/l α -Oxoglutarat,
240 mMol/l Aspartat,
80 mMol/l Trispuffer pH 7,8.

Bei diesem Reagenz ist ein Gehalt an LDH erforderlich, da jede Probe endogenes Pyruvat und in der Regel auch endogene LDH enthält. Dies führt zu einer Schleichreaktion durch langsamen Abbau von Pyruvat, der durch Zusatz von überschüssiger, erfindungsgemäß einzusetzender LDH innerhalb kurzer Zeit abläuft.

Diese "Nebenreaktion" tritt naturgemäß auch bei der GPT-Bestimmung in gleicher Weise auf, wird hier jedoch von dem größeren Problem der α -Hydroxyglutaratdehydrogenase-Aktivität überlagert. Durch die Erfindung werden jedoch beide Probleme gleichzeitig gelöst.

Daraus ergibt sich, daß erfindungsgemäß eine Vervielfachung der Lagerungsbeständigkeit erzielt wird.

Ein für die Erfindung geeignetes Enzympräparat aus *Lactobacillus leichmannii* DSM 2699 kann nach den bekannten Verfahren zur Gewinnung von mikrobieller LDH hergestellt werden, beispielsweise nach dem in J. of General Microbiology (1970) 62, 243 beschriebenen Verfahren. Dieses Verfahren wird im Prinzip wie folgt durchgeführt:

Zellaufschluß von in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7 suspendiertem *Lactobacillus* mittels Ultraschall.
Zentrifugation und Verwerfen der Zelltrümmer.

Der erhaltene Mikroorganismus-Rohextrakt wird mit Essigsäure auf pH 5,5 gebracht, mit Protaminsulfat auf 0,3 % G/V versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird auf pH 7 eingestellt und die mit Ammoniumsulfat zwischen 50 und 85 % Sättigung ausfallende Fraktion gewonnen. Diese Fraktion wird in Puffer pH 7 über einen schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex[®] A 50) chromatographiert und mit einem NaCl-Gradienten eluiert.

Man erhält mit ca. 25%iger Ausbeute ein LDH-Präparat, welches gegenüber dem Rohextrakt um den Faktor 30 oder mehr gereinigt ist. Dieses Verfahren eignet sich auch für die anderen Stämme der Gattung *Lactobacillus* und die Gattung *Leuconostoc*, z. B. für *L. lactis* DSM 20072, *L. plantarum* DSM 20174 und *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193. Bei *Pediococcus*-Stämmen wird das Verfahren gemäß J. of Bacteriology, Vol. 121, p. 602 angewendet.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

B e i s p i e l 1

Bestimmung der GPT-Aktivität (Version mit Phosphatpuffer)

Probenmaterial: Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma

Reagenzien: (Endkonzentrationen im Test)

Phosphatpuffer	80 mMol/l pH 7,4
L-Alanin	800 mMol/l
LDH	≤ 1200 U/l
NADH	0,18 mMol/l
α-Ketoglutarat	18,0 mMol/l

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 365 nm, 340 nm oder Hg 334 nm

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Meptemperatur: 25°C

Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

Bei Photometern mit Analoganzeige Anfangsextinktionen über 0,500 mit Stufenschaltung kompensieren.

In eine Küvette pipettieren:	
Reaktionsgemisch (25°C) Probe	2,5 ml 0,5 ml
mischen. Nach ca. 1 Minute Extinktion ablesen und gleichzeitig Stoppuhr starten. Nach genau weiteren 1, 2 und 3 Minuten Ablesung wiederholen.	

Bei Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) von 0,06 bis 0,08 (Hg 365) bzw. 0,11 bis 0,18 (Hg 334 und 340 nm) werden nur die Messungen der ersten zwei Minuten berücksichtigt (1 Minute inkubieren und 2 Minuten messen).

Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) Mittelwert bilden und diesen in die Berechnungen einsetzen.

Berechnung

Die Aktivität der GPT in der Probe berechnen nach:

$$U/l (25^\circ\text{C}) = 1765 \times \Delta E_{365} \text{ nm/Min}$$

$$U/l (25^\circ\text{C}) = 952 \times \Delta E_{340} \text{ nm/Min}$$

$$U/l (25^\circ\text{C}) = 971 \times \Delta E_{334} \text{ nm/Min}$$

B e i s p i e l 2

Bestimmung der GOT-Aktivität (Version mit TRIS-Puffer)

Probenmaterial: Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma

Reagenzien: (Endkonzentrationen im Test)

Tris-Puffer	100 mMol/l pH 7,5
NADH	0,18 mMol/l
MDH	600 U/l
LDH	1200 U/l
α -Ketoglutarat	12 mMol/l
L-Aspartat	200 mMol/l

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: Hg 365 nm, 340 nm oder 334 nm

Küvette: 1 cm Schichtdicke

Meßtemperatur: 25°C

Messung gegen Luft (Extinktionsabnahme)

Reagenzlösung (25°C)	2,5 ml
Probe	0,5 ml
mischen, Lösung in Küvette gießen. Nach ca. 1 Minute Extinktion ablesen und gleichzeitig Stoppuhr starten. Nach genau weiteren 1, 2 und 3 Minuten Ablesung wiederholen.	

Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) Mittelwert bilden und diesen in die Berechnung einsetzen.

Berechnung

Die Aktivität der GOT in der Probe aus der Tabelle entnehmen oder berechnen nach

$$U/1 (25^\circ\text{C}) = 2059 \times \Delta E_{365} \text{ nm/min}$$

$$U/1 (25^\circ\text{C}) = 1111 \times \Delta E_{340} \text{ nm/min}$$

$$U/1 (25^\circ\text{C}) = 1133 \times \Delta E_{334} \text{ nm/min.}$$

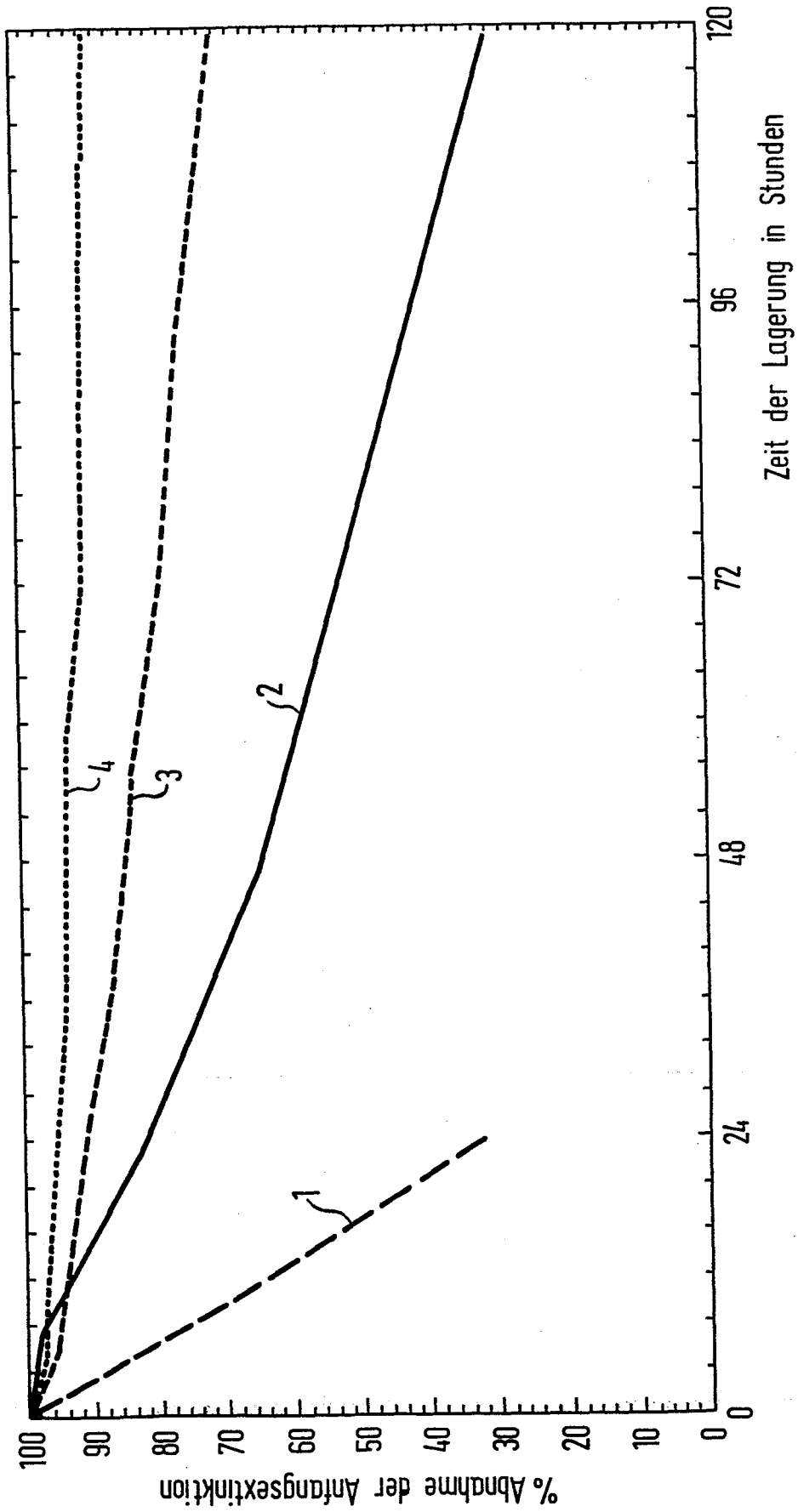
P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung der Transaminasen durch Umsetzung einer entsprechenden Aminosäure mit α -Ketoglutarsäure zu Glutarsäure und der der eingesetzten Aminosäure entsprechenden α -Ketosäure und Messung der gebildeten α -Ketosäure durch Reduktion mit NADH in Gegenwart von Lactatdehydrogenase (LDH) und gegebenenfalls Malatdehydrogenase (MDH) unter Bildung von NAD⁺ und α -Oxisäure, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man D-LDH eines Milchsäurebacteriums verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man D-LDH aus Mikroorganismen der Gattung Lactobacillus Pediococcus oder/und Leuconostoc verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bestimmt und als Aminosäure Alanin einsetzt, welches zu Pyruvat desaminiert und zu Lactat reduziert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bestimmt und als Aminosäure Aspartat einsetzt, welches zu Oxalacetat desaminiert und zu Malat reduziert wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man D-LDH aus *Lactobacillus leichmannii* DSM 2699, *Lactobacillus lactis* DSM 20072, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193 oder *Pediococcus pentosaceus* DSM 20280 verwendet.
6. Reagenz zur Bestimmung der Transaminasen, enthaltend LDH, α -Oxoglutarat, die entsprechende Aminosäure, NADH, Puffer pH 6,5 bis 8,5 und gegebenenfalls MDH, dadurch gekennzeichnet, daß es D-LDH eines Milchsäurebacteriums enthält.
7. Reagenz nach Anspruch 6 zur Bestimmung von GPT, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäure Alanin enthält.
8. Reagenz nach Anspruch 6 zur Bestimmung von GOT, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäure Aspartat enthält.
9. Reagenz nach Anspruch 7, enthaltend
250 bis 20000 U/l D-LDH aus Milchsäurebakterien,
2,5 bis 100 mMol/l α -Oxoglutarat,
50 bis 1000 mMol/l Alanin,
0,01 bis 0,25 mMol/l NADH und
10 bis 500 mMol/l Puffer pH 6,5 bis 8,5.
10. Reagenz nach Anspruch 8, enthaltend
250 bis 20000 U/l D-LDH aus Milchsäurebakterien
2,5 bis 100 mMol/l α -Oxoglutarat
20 bis 1000 mMol/l Aspartat

0,01 bis 0,25 mMol/l NADH
100 bis 20000 U/l MDH und
10 bis 500 mMol/l Puffer pH 6,5 bis 8,5.

11. Reagenz nach einem der Ansprüche 6 bis 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß es D-LDH aus einem Mikroorganismus der Gat-
tung Lactobacillus Pediococcus oder/und Leuconostoc
enthält.
12. Reagenz nach Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß es D-LDH
aus Lactobacillus leichmanii DSM 2699, Lacto-
bacillus lactis DSM 20072, Lactobacillus plantarum
DSM 20174, Leuconostoc mesenteroides DSM 20193
oder Pediococcus pentosaceus DSM 20280 verwendet.





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

01 39985

Nummer der Anmeldung

EP 84110018.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	DE - A1 - 3 026 854 (SERENO PHARM. PRÄPARATE) * Anspruch 1; Seiten 8,9 *	1,6	C 12 Q 1/52
X	* Anspruch 1; Seite 6, Zeilen 22-28; Beispiele 1,2 * --	3,4,7, 8,9	
A	US - A - 3 527 332 (A. DEUTSCH) * Beispiel A; Ansprüche 1,2 * ----	1,3,6, 7,9	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			C 12 Q 1/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 28-11-1984	Prüfer IRMLER
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			